

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI



*UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES*

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

TESIS DE GRADO PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TÍTULO

**EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS OVOCITOS EN
CERDAS DE CAMAL SEGÚN CONDICIÓN CORPORAL 2 3 Y 4**

AUTOR: Oscar Eucebio Manjarrés Frías

DIRECTORA: MVZ. Paola Jael Lascano Armas

LATACUNGA - ECUADOR

2015

AUTORÍA

Yo, Oscar Eucebio Manjarrés Frías, declaro que el trabajo aquí descrito, la responsabilidad de la investigación, ideas expuestas, resultados y conclusiones de la presente tesis son de mi autoría y que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica de Cotopaxi puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

.....

Oscar Eucebio Manjarres Frías

180294273-8

**AVAL DE APROBACIÓN
DE LA DIRECTORA DE TESIS**

En mi calidad de Directora de Tesis titulada: **“EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS OVOCITOS EN CERDAS DE CAMAL SEGÚN CONDICIÓN CORPORAL 2 3 Y 4** Propuesta por el egresado Oscar Manjarrés Frías como requisito previo a la obtención del Título de Médico Veterinario Zootecnista, de acuerdo con el Reglamento de Títulos y Grados, considero que el trabajo mencionado reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación pública y evaluación por parte del Tribunal Examinador que se designe.

.....
MVZ. Paola Lascano
DIRECTORA DE TESIS

**AVAL DE APROBACIÓN
DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL**

**“EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS OVOCITOS EN
CERDAS DE CAMAL SEGÚN CONDICIÓN CORPORAL 2, 3 Y 4”.**

Fue revisado por:

.....
Dra. Mg. Blanca Mercedes Toro Molina
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

.....
Dra. Mg. Patricia Marcela Andrade Aulestia
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

.....
MVZ. Mg. Blanca Jeaneth Villavicencio Villavicencio
OPOSITOR DEL TRIBUNAL

AVAL DE TRADUCCIÓN DE INGLES

AGRADECIMIENTO

A mis Padres por darme la vida, por su gran apoyo tanto moral como económico para poder formarme como profesional.

A mi esposa y mis hijos, que siempre estuvieron en todos los momentos buenos y malos de mi vida apoyándome para culminar con éxito esta parte importante de mi vida.

A mis familiares y amigos, que siempre estuvieron dándome el ánimo y apoyo necesarios para culminar con éxito esta investigación.

A la MVZ. Paola Lascano, por haberme apoyado desinteresadamente en la realización de este trabajo como Directora de Tesis.

A la Universidad Técnica de Cotopaxi en especial a la Carrera de Medicina Veterinaria, a todos los maestros que me transmitieron sus conocimientos para realizarme como persona y profesional.

.....
Oscar Eucebio Manjarrés Frías

180294273-8

DEDICATORIA

Dedico la presente tesis a las personas que más importantes de mi vida.

A mis Padres, Luis Manjarrés y Marina Frías, gracias a su trabajo, esfuerzo y darme la oportunidad de educarme, agradezco sus consejos, su apoyo moral, económico, pude culminar esta meta tan anhelada, y así cumplir mi sueño que hoy se ve plasmado de verme formado como todo un profesional.

A mi amiga confidente esposa Liliana Salazar, por ser una de las gestoras fundamentales en la culminación de este proyecto ya que gracias comprensión y paciencia ha sido la base para yo poder alcanzar este logro en mi vida.

A mis hijos Daniel, Lisette y Nahomi, por ser la fuerza y que me empuja a seguir siempre adelante ya que con su cariño y ternura son la luz de mi vida.

A mis hermanos Patricio, Leonel, Santiago y Mayra, que siempre estuvieron junto a mí, en todos los momentos buenos y malos dándome el apoyo necesario para lograr una de mis metas como es culminar mis estudios.

.....
Oscar Eucebio Manjarrés Frías.

180294273-8

ÍNDICE

Portada	I
Declaración expresa del autor.....	II
Aval de la Directora de Tesis.....	III
Carta de aprobación de los miembros del tribunal.....	IV
Aval del resumen de inglés.....	V
Agradecimiento.....	VI
Dedicatoria.....	VII
Índice de Contenidos.....	VIII
Índice de gráficos.....	XIII
Índice de tablas.....	XIV
Índice de cuadros.....	XV
Índice de anexo.....	XVI
Resumen.....	XVII
Abstract.....	XVIII
Introducción.....	XIX
Objetivos.....	XX
Hipótesis.....	XX
CAPITULO I.....	1
1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	1
1.1. Anatomía y fisiología del aparato reproductor de la cerda.....	1
1.1.1 Ovarios.....	1
1.1.2 Oviducto.....	2
1.1.3 Útero.....	2

1.1.4 Cérvix.....	2
1.1.5 Vagina.....	3
1.1.6 Genitales externos.....	3
1.2. Ciclo Estral.....	3
1.3. Condición corporal.....	5
1.4. Manejo Reproductivo.....	7
1.5. Dinámica folicular.....	8
1.5.1 Reclutamiento.....	8
1.5.2 Selección.....	8
1.5.3 Dominancia.....	8
1.6. Ovogénesis.....	9
1.6.1 Ciclo ovárico.....	9
1.6.2 Ciclo uterino.....	10
1.6.3 Ciclo cervical.....	10
1.7. Foliculogénesis.....	10
1.7.1 Folículos primordiales.....	11
1.7.2 Folículos primarios.....	11
1.7.3 Folículos secundarios.....	11
1.7.4 Folículos terciarios o de De Graaf.....	12
1.8 Recolección y transporte de ovarios.....	14
1.8.1 De material del lugar de faenamiento.....	14
1.8.2. Métodos de recolección de ovocitos.....	14
1.8.2.1 Recolección de ovocitos por punción.....	14
1.8.2.2 Recolección de ovocitos por corte folicular.....	15
1.9. Calificación de ovocitos por calidad y madurez.....	15

1.10. Técnicas de crioconservación.....	17
1.10.1 Congelación lenta.....	17
1.10.2 Vitricación.....	18
CAPÍTULO II.....	19
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
2.1 Características del lugar.....	19
2.2 Materiales.....	20
2.2.1 Materiales de oficina.....	20
2.2.2 Recursos tecnológicos.....	20
2.2.3 Materiales de laboratorio.....	21
2.2.4 Materiales de campo.....	21
2.2.5 Material biológico.....	21
2.3 Tipo de Investigación.....	22
2.3.1 Investigación experimental.....	22
2.3.2 Investigación Descriptiva.....	22
2.4 Metodología.....	22
2.4.1 Métodos.....	22
2.4.2 Método deductivo.....	22
2.4.3 Método científico.....	22
2.5 Análisis estadístico.....	23
2.5.1 Unidad de estudio.....	23
2.6 Variables evaluadas.....	23
2.6.1 Calidad de ovocitos.....	23
2.6.2 Madurez de los ovocitos.....	23
2.7 Manejo del ensayo.....	24

2.7.1 Recolección de ovarios de cerdas faenadas.....	24
2.7.2 Selección del ovocito.....	24
2.7.3 Selección de ovocitos por calidad y madurez.....	25
2.7.4 Crioconservación de ovocitos.....	26
2.7.5 Descongelamiento de ovocitos.....	26
CAPÍTULO III.....	27
3. Análisis de los Resultados.....	27
3.1 Resultados obtenidos de los ovocitos de cada ovario.....	27
CONCLUSIONES.....	37
RECOMENDACIONES.....	38
BIBLIOGRAFÍA.....	49
ANEXOS.....	44

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico No 1. Cambios hormonales y ováricos durante el ciclo estral.....	5
Gráfico No 2. Esquema de la ovogénesis.....	10
Gráfico No 3. Esquema de la foliculogénesis.....	12
Gráfico No 4. Microfotografías de un corte de ovario I.....	13
Gráfico No 5. Microfotografías de un corte de ovario II.....	13
Gráfico No 6. Microfotografías de un corte de ovario III.....	13
Gráfico No 7. Punción de folículos.....	15
Gráfico No 8. Porcentaje general de ovocitos por condición corporal.....	29
Gráfico No 9. Porcentaje de ovocitos según condición corporal.....	31
Gráfico No.10 Porcentaje de ovocitos por categorías de madurez.....	33
Gráfico No11. Porcentaje de ovocitos total en madurez.....	34
Gráfico No 12. Resultado de la crioconservación de los ovocitos.....	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1 Resultados generales de la calidad de los ovocitos.....	28
Tabla N° 2 Resultados de la calidad de ovocitos según condición corporal..	30
Tabla N° 3 Resultados de madurez de ovocitos de la categoría 1.....	32
Tabla N°5 Resultado de la crioconservación de ovocitos.....	35

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro No 1 Descripción de la condición corporal de la cerda.....	6
Cuadro No 2 Clasificación de los ovocitos.....	16

ÍNDICE DE ANEXO

Anexo 1. Registro del total de ovocitos recolectados.....	42
Anexo 2. Registro para el numero de ovocitos por categorías.....	43
Anexo 3. Registro de calidad y madurez de ovocitos categoría 1.....	44
Anexo 4. Animales de matadero según condición corporal.....	45
Anexo 5 Muestras (ovario de cerdas faenadas y clasificadas).....	45
Anexo 6 Limpieza de los ovarios.....	45
Anexo 7 Aspiración	46
Anexo 8 Obtención del líquido folicular.....	46
Anexo 9 Lavado de ovocitos	46
Anexo 10. Adición del crioprotector.....	47
Anexo 11 Congelación de ovocitos.....	47
Anexo 12 Clasificación de ovocitos.....	47
Anexo 13 Calidad de ovocitos después de la congelación.....	48

RESUMEN

EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS OVOCITOS DE CERDAS DE CAMAL CON CONDICIÓN CORPORAL 2,3Y4 EN EL LABORATORIO DE MEDICINA VETERINARIA EN CEYSA.

El objetivo principal de la presente investigación fue evaluar las características de los ovocitos según la condición corporal en cerdas de camal mediante un laboratorio de biotecnología CEYPSA de reproducción para evidenciar su funcionalidad. Para ello se recolectaron ovarios de cerdas de camal recolectados en el camal de Ambato, el procedimiento se realizó con 30 ovarios según condición corporal las cuales fueron clasificadas en tres grupos, G1 (CC2), G2 (CC 3), G3 (CC4). Se obtuvo 218 ovocitos equivalente al 100% de los tres grupos, de los cuales se clasificó según su calidad en categorías, obteniendo 157 ovocitos de categoría I, representando el 72,02%, 28 ovocitos de categoría II, representando el 12,844%, y 33 ovocitos de categoría III, representando el 15,14%. En el G1 64 ovocitos en donde 39 son categoría I en el parámetro calidad; en el G2 99 ovocitos con 88 de calidad I y en el G3 con 55 ovocitos, con 36 calidad I, por tanto en el parámetro calidad se obtiene de 163 ovocitos. Lo que evidencia que a la condición corporal 3 presentan más actividad folicular y por ende más ovocitos que en animales con condición corporal 2 y 4. De acuerdo a la práctica realizada en el Laboratorio CEYPSA, se determinó y se recomienda que las cerdas con condición corporal 3, son los animales más óptimos para recolectar ovocitos para obtener nuevas crías con características genéticas similares y de calidad teniendo en cuenta que luego de ser adecuadamente crioconservados no sufren alteración alguna

EVALUATION OF THE CHARACTERISTICS OF THE OOCYTES OF CAMAL BRISTLES WITH BODY CONDITION 2, 3 AND 4 IN THE LABORATORY OF VETERINARY IN CEYSA MEDICINE.

The main objective of this research was to evaluate the characteristics of the oocyte according to body condition bristle of slaughterhouse through a CEYPSA biotechnology of reproduction laboratory to demonstrate its functionality. Bristles from slaughterhouse ovaries collected in the slaughterhouse of Ambato were collected for this purpose, the procedure was carried out with 30 ovaries according to body condition, which were classified into three groups, G1 (CC2), G2 (3 CC), G3 (CC4). Was obtained 218 oocytes equivalent to 100% of the three groups, which will I qualify according to their quality in categories, obtaining 157 oocytes of category I, representing 72,02%, 28 oocytes from category II, representing 12.844%, and 33 oocytes from category III, representing 15.14%. In the G1 64 oocytes in which 39 are the quality parameter category I; in the G2 99 oocytes with 88 and quality I in the G3 with 55 oocytes, with 36 quality I, therefore the parameter quality is obtained from 163 oocytes. What evidence that body condition 3 have more activity follicular and hence more oocytes than in animals with body condition 2 and 4. According to practice in the laboratory CEYPSA, was determined and it is recommended that bristles with body condition 3, are the best to collect oocytes for new babies with similar genetic characteristics and quality taking into account then properly be Cryopreserved not suffering any alteration

INTRODUCCIÓN.

La crioconservación de células ha permitido que el material biológico de diferentes especies animales, sea almacenado sin perder sus funciones y sin alteraciones genéticas. Se han diseñado distintas técnicas para la crioconservación de ovocitos.

El objetivo general de la crioconservación de ovocitos según la condición en cerdas es el controlar la velocidad de enfriamiento de tal forma que a medida que desciende la temperatura se produzca la penetración del crioprotector al interior de la célula produciéndose un equilibrio osmótico y disminuyendo la probabilidad de formación de cristales de hielo intracelulares.

La crioconservación de ovocitos de cerdas para una posterior fertilización in vitro, es una técnica de reproducción asistida que resulta útil cuando las hembras de alto valor genético presentan pérdida prematura de la función ovárica debido a procesos patológicos o mueren debido a accidentes o enfermedades, se pueden extraer los ovarios y aspirar los ovocitos con el fin de crioconservarlos y posteriormente fertilizarlos para obtener embriones.

Se han realizado diferentes trabajos de investigación referentes a la crioconservación destinadas a diferentes especies animales, con resultados variables. En el campo científico es importante contar con ovocitos crioconservados, pues poseen una excelente fuente de material biológico que será útil para el desarrollo de nuevas técnicas que aporten a la reproducción asistida.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar las características de los ovocitos según la condición corporal en cerdas de camal mediante un laboratorio de biotecnología CEYPSA de reproducción para evidenciar su funcionalidad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la calidad de ovocitos según la condición corporal de cerdas del camal, mediante la identificación de estructuras para observar su funcionalidad.
- Analizar la madurez de los ovocitos en condición corporal diferente mediante la compactación de membranas para evidenciar la aptitud de fertilización.
- Evaluar las características de calidad en ovocitos descongelados de hembras evaluadas en las diferentes condiciones corporales mediante microscopia para determinar su viabilidad post descongelamiento.

HIPÓTESIS

H₀: El factor condición corporal incide en la calidad, cantidad y madurez de los ovocitos.

H₁: El factor condición corporal no incide en la calidad, cantidad y madurez de los ovocitos.

CAPITULO I

1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

En este capítulo se apoya en material bibliográfico para fundamentar científicamente sobre el tema de la presente investigación.

1.1 Anatomía y fisiología del aparato reproductor de la cerda

Los órganos reproductivos de la hembra se componen de ovarios, oviductos, útero cérvix, vagina y genitales externos. (BRONIO, H. 2003).

1.1.1. Ovarios.

Es el principal órgano reproductivo de la hembra ya que produce los óvulos y las hormonas (estrógeno y progesterona). La capa exterior o corteza del ovario contiene óvulos en distintas etapas de desarrollo, así como también vasos sanguíneos, nervios y fibras musculares. En el ovario activo se distinguen dos capas. Una capa cortical (córtez ovárica) donde tendrá lugar el desarrollo de los folículos y de los ovocitos y en la que se encuentran también células secretoras de hormonas; y una segunda capa medular con tejido conectivo, vascular y nervioso. (HAFEZ, E. 2003).

La capa cortical del ovario en todas las hembras de animales domésticos, excepto en la yegua, está ocupada por los folículos ováricos en distintas fases de evolución. Esta capa queda envuelta por la túnica albugínea (membrana fibrosa que cubre al ovario), dicha túnica se va infiltrando en profundidad hasta definir el estroma ovárico que mantiene los folículos en evolución. Entre sus principales funciones: gametogénesis (función exocrina), formación de ovocitos, síntesis de hormona (función endocrina), producción de estrógenos (folículos), progesterona (cuerpo lúteo), inhibina, oxitocina y relaxina. (BRONIO, H. 2003)

1.1.2 Oviducto.

Es el lugar donde se produce la fertilización, sirve para permitir el proceso de adaptación de los espermatozoides, conocidos como capacitación y es el lugar donde comienza el desarrollo embrionario. En la parte superior del oviducto se encuentra el infundíbulo (“ostium tubae”) que rodea el ovario. Esta estructura produce fluidos de forma rítmica que al momento de la ovulación, transportan el óvulo hasta el oviducto. Se trata de conductos finos, blanquecinos, flexuosos y de unos 2 cm de longitud; en ellos se produce precisamente la fecundación ovular. (SISSON y GROSSMA 2002).

1.1.3 Útero.

Es el órgano donde se produce casi en su totalidad el desarrollo embrionario y provee la fuerza muscular necesaria para la expulsión del feto al momento de nacer. En el caso de las conejas, el útero está formado por dos “cuernos” distintos. Cada cuerno posee una cervix que se abre hacia la vagina. (FRANCO, F. 1998)

1.1.4 Cérvix.

Sirve a manera de un tapón que mantiene los cuernos uterinos cerrados hasta el momento del apareamiento y parto. (FRANCO, F. 1998).

1.1.5 Vagina.

Es el lugar donde se deposita el semen al momento del parto y sirve como canal para el feto al momento del alumbramiento. Es un conducto que mide de 6 a 10 cm de largo, en cuyo tercio final desemboca la uretra. (FRANCO, F. 1998)

1.1.6 Genitales externos.

Incluyen el seno urogenital que es el lugar donde coinciden la vagina y la uretra. Los labios exteriores del seno urogenital forman la vulva. El clítoris descansa dentro del seno urogenital y se proyecta hacia la apertura urogenital. Debido a la localización de la uretra, el que la coneja orine después del parto no interfiere necesariamente con la fertilización. La vulva mide escasamente 1 cm. La coloración de la vulva tiene cierto interés para averiguar las posibilidades de aceptación del macho (GADELLA, M. 1998).

1.2 Ciclo Estral.

La cerda es un animal poliéstrico que en condiciones favorables manifiesta su actividad sexual a lo largo de todo el año. Su ciclo estral es de aproximadamente 21 días con un rango de 15 a 25 días. De acuerdo a los cambios que tiene lugar tanto en sus manifestaciones externas como internas se dividen en cuatro fases: Proestro, Estro, Metestro, Diestro (ALBARRÁN, 1990).

Proestro: esta fase dura unos dos días y las hembras comienzan a montarse entre sí, sin aceptar al macho. Se reflejan síntomas externos como un enrojecimiento de la vulva y la presencia de algunas secreciones. En algunas hembras esta fase se puede alargar excesivamente hasta por 5 ó 7 días. Internamente se desarrollan los folículos terciarios en el ovario, incrementándose la secreción estrogénica e iniciándose la preparación de los órganos tubulares y de la vulva con su tumefacción característica. (BRITO, 1999).

Estro: El mismo dura entre 2 y 3 días, existiendo inflamación vulvar, pueden presentarse secreciones mucosas en la comisura vulvar, la cerda gruñe con frecuencia, come poco y se muestra inquieta, puede comportarse agresiva y lo más típico es el reflejo de inmovilidad o de quietud en presencia del macho, el cual es aprovechado para efectuar la monta o la inseminación artificial. Entre 26 y 40 horas de haber comenzado el celo debe llevarse a cabo la ovulación. El celo es la fase más importante del ciclo estral porque es el momento en que se realiza el apareamiento. (BRITO, 1999).

Metestro: Esta fase dura alrededor de 7 días, momento en que se organiza el cuerpo lúteo y comienza la producción de progesterona. (BRACKET, G, 2001).

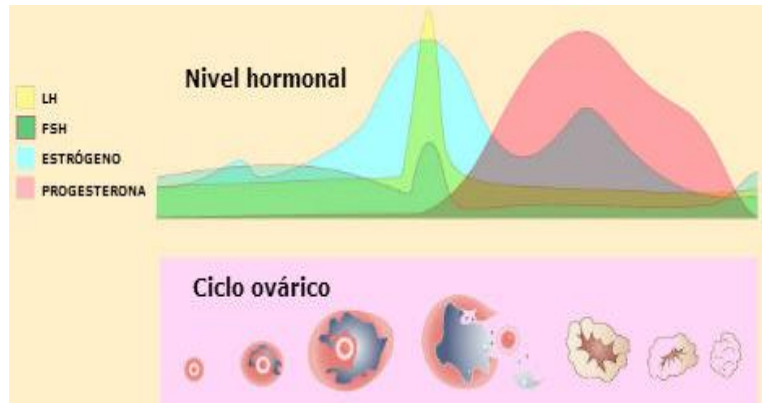
Diestro: Dura alrededor de 9 días y se produce progesterona y si no ocurre la gestación, al final comienza la regresión del cuerpo lúteo, por el nivel de progesterona circulante en sangre, comenzando la maduración de nuevos folículos y con ello el inicio de un nuevo ciclo estral. (OGLESBEE, B.1998).

El mecanismo que regula el ciclo sexual determinando la duración y el fisiologismo de sus fases se sustenta por el equilibrio del SNC y el sistema endocrino. Las formas en que estas funciones pueden manifestarse estarán muy influidas por las condiciones existentes entorno a estas, (ALBARRAN, E.2007).

En el transcurso del ciclo estral los ovarios sufren una serie de cambios que finalizan con la ovulación y la expulsión de ovocitos capacitados para ser fecundados, estos cambios están regulados por diversas hormonas procedentes de distintos órganos hipotálamo, hipófisis, ovarios y útero. (BRACKET, G.2003).

La GnRH es una hormona de origen hipotalámico que estimula en la adenohipófisis la secreción de FSH y de la LH; la FSH es responsable del inicio de la oleada del crecimiento folicular al estimular el reclutamiento, mientras que la LH interviene en la maduración final del folículo dominante y en la ovulación. (CALDERÓN, R.2007).

GRÁFICO 1. CAMBIOS HORMONALES Y OVÁRICOS DURANTE EL CICLO ESTRAL.



Fuente: HERNANDEZ, Cerón (2007).











Fisiología reproductiva de animales de granja

1.3 Condición corporal

Las cerdas son grandes productoras de leche, aunque su lactancia dure tan sólo tres o cuatro semanas, cumplen con esa función primordial movilizándolo y drenando considerables masas de reservas corporales que condicionan su futuro reproductivo, es decir productividad. (CASTELLANOS, F.2008).

Por eso resulta muy útil y práctico disponer de una escala que aporte información cuantitativa sobre el estado corporal de las cerdas para usarla como herramienta o referencia en el ajuste de pautas de manejo o alimentación que apunten a mejorar la función reproductiva (FRANCO, F. 1998).

CUADRO 1. DESCRIPCIÓN DE LA CONDICIÓN CORPORAL DE LA CERDA

Grado	Descripción	Vista Posterior	Vista Lateral
1	Extremadamente flaca. Las apófisis espinosas de la espina dorsal prominentes, los huesos de la pelvis son muy notorios. Nada de grasa de cobertura.		
	Flaca Los huesos visibles, aún prominentes cuando se los palpa, huesos de la pelvis apenas cubiertos.		
3	Regular Tiene adecuada cobertura. Los huesos de la columna y pelvis se sienten cuando se los palpa con moderada presión		
	Buena Los huesos pueden palparse sólo con una presión firme. La cerda está redondeada con buena cobertura de grasa. Pelo brillante y piel en buen estado.		
5	Gorda Los huesos son difíciles de palpar. Arrugas arriba de la base de la cola. Las cerdas son muy gordas, perezosas y letárgicas		

(FRANCO, F. 1998).

El estado óptimo del destete sería entre el grado 2 y el grado 3, más cerca del 3. La mayoría de las cerdas deberían estar entre estos dos grados, sólo unas pocas podrían caer en el grado 4 y ninguna en el grado 1. (FRANCO, F. 1998).

1.4 Manejo Reproductivo.

La cerda es una hembra poliéstrica continua, aunque puede haber una reducción de la fertilidad en los meses más cálidos. La regulación hormonal de la reproducción viene determinada por el eje Hipotálamo Hipófisis-Ovario como en todas las hembras domésticas (COMPENDIUM DE REPRODUCCIÓN ANIMAL. INTERVET).

La fase folicular dura 5-6 días desarrollándose los folículos ováricos y aumentando la secreción de estradiol y LH, que conducen al celo. Posteriormente aparece la fase luteal con el desarrollo de los cuerpos lúteos y la producción de progesterona que va a bloquear la secreción de FSH y LH. Si no ha habido fecundación este cuerpo lúteo es sensible a las prostaglandinas a partir del día 12 desde el inicio del celo, comenzando la fase de regresión de este cuerpo que dará lugar a un nuevo ciclo estral, que se repetirá si no hay fecundación ni problemas patológicos cada 21 días (COMPENDIUM DE REPRODUCCIÓN ANIMAL. INTERVET).

Si existe fecundación se mantienen los niveles altos de progesterona secretada por el cuerpo lúteo que prepara al útero para la gestación. La implantación tiene lugar a los 13-14 días de la fertilización, de forma que este periodo y las dos o tres primeras semanas tras la implantación son un periodo crítico para el mantenimiento de la gestación. Tras el parto, en la cerda lactante el estro y la ovulación están inhibidos por unos niveles plasmáticos bajos y una baja frecuencia en los pulsos de LH, pero el destete va seguido de un incremento de estos pulsos que van a determinar la aparición del estro y la ovulación a los 4-10 días del destete de los lechones. Los niveles de FSH tienen un importante papel en el nº de folículos ováricos que maduran, afectando por tanto a la tasa de ovulación

y a la prolificidad Los principales parámetros reproductivos en la cerda se pueden esquematizar (SANCHEZ, M 2008).

Parámetro reproductivo Valor medio Edad a la Pubertad 4-9 meses (media 7 meses en razas precoces) Duración del ciclo ovárico 16-24 días (media 21 días) Duración celo 2-3 días Momento óptimo fecundación 24 después del celo Primer celo postparto 4-10 días después del destete Duración de la gestación 112-115 días (3 meses, 3 semanas y 3 días) Indicador Valor medio Óvulos maduros 18 Huevos anidados 14 Embriones atróficos 2 Embriones a término 12 Nacidos vivos 11-12 Destetados 10-11 Indicadores de fertilidad y prolificidad en la cerda. (BIENESTAR ANIMAL EN EXPLOTACIONES 2002).

1.5 Dinámica folicular.

El proceso de crecimiento continuo y la regresión de folículos antrales, que termina con el desarrollo de folículos preovulatorios, se conoce con el nombre de dinámica folicular. Se destacan tres procesos importantes que son: reclutamiento, selección y dominancia. (AZADA, D. 2008)

1.5.1 Reclutamiento.

Es el proceso por el que bajo la responsabilidad de la FSH, un conjunto de folículos antrales tempranos, comienzan a crecer en un medio con suficiente soporte gonadotrófico que les permita progresar a la ovulación. (CUERTA, A. 2008).

1.5.2 Selección.

Es el proceso por el cual un folículo evita la atresia con la posibilidad de llegar a la ovulación. (ALBARRAN, E.2007).

1.5.3 Dominancia.

Sucede cuando el folículo ovárico alcanza un tamaño determinado, lo cual es señal que ese folículo escapo a la atresia y secreta productos (Inh y E2), capaces de inhibir el reclutamiento de una nueva onda folicular y el crecimiento de los

folículos de su cohorte. Cuando el folículo dominante encuentra el ambiente hormonal adecuado (bajos niveles de P4), es capaz de ovular y como consecuencia se formara el cuerpo lúteo. En caso contrario cuando el folículo dominante llega a la fase de dominancia durante la fase luteal, en la cual existen altos niveles de P4, cuando los niveles de LH no son suficientes para promover su crecimiento final y ovulación, este folículo dominante pierde su dominancia y permite el reclutamiento y la emergencia de una nueva cohorte de folículos del cual saldrá el próximo folículo dominante. (SEPULBEDA, H. 2011).

1.6 Ovogénesis

La ovogénesis es la gametogénesis de la hembra, es decir, es el desarrollo y diferenciación del gametocito femenino u ovocito mediante una división meiótica. En este proceso se produce a partir de una célula diploide: una célula haploide funcional (el ovocito), y tres células haploides no funcionales (los cuerpos polares). Las ovogonias se forman a partir de las células germinales primordiales (CGP). Se originan en el epiblasto y migran por el intestino primitivo a la zona gonadal indiferenciada en la etapa de gestación. (ALBARRACÍN, M. 2005)

Una vez en el ovario, experimentan mitosis, momento en el cual el número de ovogonias ha alcanzado una máxima cantidad para luego reducirse y solo un porcentaje de estas serán ovuladas a partir de la pubertad. Después del nacimiento, las ovogonias se diferencian en ovocitos primarios que entran en la profase de la meiosis y comienza a formarse el folículo, inicialmente llamado folículo primordial. El proceso de meiosis queda detenido en la profase por medio de hormonas inhibitoras hasta la maduración sexual. (BRACKET, G 1999)

1.6.1 Ciclo ovárico.

Su función es madurar un grupo de ovocitos primordiales, que progresivamente completan de segunda división meiótica y desarrollan una cubierta de células del estroma ovárico, lo que se denomina folículo en desarrollo. Solo uno de los folículos se desarrolla hasta la fase de folículo maduro, en cuyo interior está un

ovocito secundario que será expulsado del ovario en estado de estro. (LLIGUISUPA, V.2013).

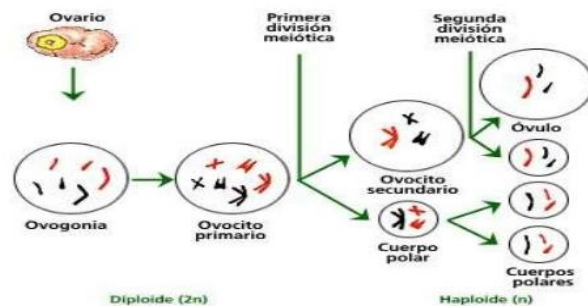
1.6.2 Ciclo uterino.

Su función es proporcionar el medio ambiente apropiado para que se implante y desarrolle el blastocisto. (LLIGUISUPA, V.2013).

1.6.3 Ciclo cervical.

Que permite al espermatozoide penetrar en las vías genitales femeninas en el momento apropiado. (ALBARRACÍN, M. 2005)

GRÁFICO.2 ESQUEMA DE LA OVOGÉNESIS.



Fuente: CAMPBELL, Reece (2002).

Biología general

1.7 Foliculogénesis.

Los folículos ováricos son estructuras formados por un conglomerado de células granulosas que encierran a cada ovocito en el interior del ovario. Dentro de los folículos tiene lugar la ovogénesis. La foliculogénesis es la formación y maduración de los folículos ováricos, a partir del folículo primordial hasta períodos intermedios o finales. De acuerdo a la etapa de desarrollo, se distinguen distintos tipos de folículos. (ESPINOZA, J.2009).

1.7.1 Folículos primordiales.

Se forman en la vida embrionaria y contiene una capa de células planas epiteliales y foliculares. Rodea al ovocito primario que está en dictiotena. Los signos más precoces que indican que ha comenzado un crecimiento en este tipo de folículos son: incremento en el tamaño del ovocito, cambio en las células granulosas, pasan a planas y cúbicas, comienza a formarse la zona pelúcida. (ALBARRACÍN, M. 2005).

1.7.2 Folículos primarios.

Están constituidos por células de forma cúbica que encierran ovocitos primarios, también en dictiotena, pero que han aumentado de tamaño. Se diferencian a partir de células germinales primordiales (oogonios) y permanecen en una profase meiótica suspendida hasta que reanudan su maduración, ovulación y atresia. Los cambios que se presentan son: crecimiento folicular, proliferación de las células de la granulosa, formación de la zona pelúcida, diferenciación de las células de taca. (OCHANDO, I.2012).

1.7.3 Folículos secundarios.

Llamados también folículos en crecimiento, son aquellos que rebasan la etapa inactiva como folículos primordiales e inician su desarrollo. Tienen un diámetro cercano a 300 micras. Poseen varias capas de células granulosas que encierran a un ovocito secundario de 90-100 micras. (HAFEZ, E. 2002).

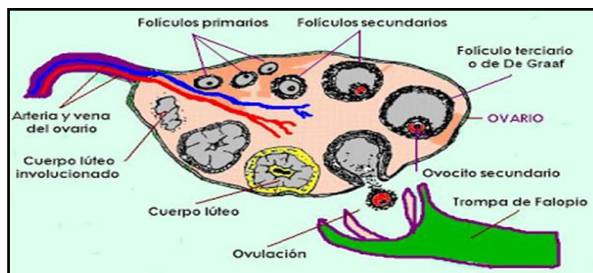
Estos provienen de la división de las células epiteliales periféricas que cercaban al folículo primordial y que posteriormente se rodean de dos o más capas de células foliculares. Su número es escaso, al comienzo en la hembra pueden encontrarse hasta 200 en el ovario. (ALBARRAN, E, CALDERÓN, R.2007).

1.7.4 Folículos terciarios o de De Graaf.

Tienen un diámetro promedio de 20 mm. Están constituidos por varias capas de células granulosas que se van ahuecando, formando un antro (antrum) que se llena de líquido a medida que se acerca a la superficie del ovario. Estas se diferencian a la zona radiada, estrado que rodea directamente al ovocito y tienen sutiles prolongaciones. (ALBARRACÍN, M. 2005).

Las células del cumulo y de la corona radiada están implicadas principalmente entre el ovocito y el medio que lo rodea: las uniones estrechas entre las células foliculares y la corona radiada por una parte y la corona radiada y el ovocito por la otra garantizan la maduración coordinada del folículo y del ovocito. La acumulación del líquido en el antro es la principal responsable del aumento del tamaño del folículo que se desarrolla hacia el folículo maduro o de Graff. El folículo terciario contiene a un ovocito secundario latente en la profase de la mitosis I (dictiotena) que se prepara para ser expulsado hacia la trompa de Falopio. (RUIZ, A. 2011).

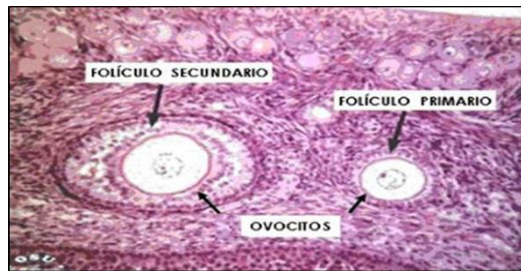
GRAFICO.3. ESQUEMA DE LA FOLICULOGÉNESIS



Fuente: <http://hnnbiol.blogspot.com/2008/01/ovogenesis.html>

Elaborado por: MANJARRÉS, Oscar.201

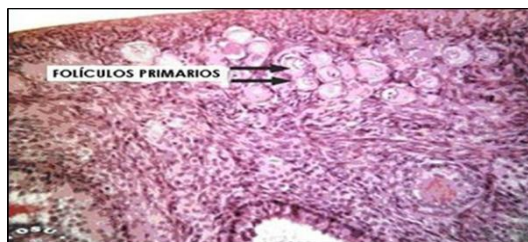
GRAFICO.4. MICROFOTOGRAFÍAS DE UN CORTE DE OVARIO I



Fuente: <http://hnnbiol.blogspot.com/2008/01/ovogenesis.html>

Elaborado por: MANJARRÉS, Oscar.2015

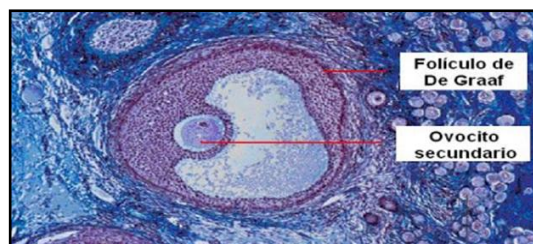
GRAFICO.5 MICROFOTOGRAFÍAS DE UN CORTE DE OVARIO II



Fuente: <http://hnnbiol.blogspot.com/2008/01/ovogenesis.html>

Elaborado por: MANJARRÉS, Oscar.2015

GRAFICO.6 MICROFOTOGRAFÍAS DE UN CORTE DE OVARIO III



Fuente: <http://hnnbiol.blogspot.com/2008/01/ovogenesis.html>

Elaborado por: MANJARRÉS, Oscar.2015

1.8 Recolección y transporte de ovarios.

Los ovarios se pueden obtener después del faenamiento de las hembras, resultando el método más práctico y económico para obtener los ovocitos con fines experimentales y comerciales. Es la que permitió el desarrollo de la producción In Vitro de embriones bovinos y la que dio comienzo a la producción de embriones en gran escala. (OCHANDO, I. 2012)

1.8.1 De material del lugar de faenamiento.

Los ovarios colectados de los animales faenados son transportados en termos que contienen suero isotónico de 35 a 37°C. La aspiración de los COCs, se realiza aproximadamente dentro de 4 a 6 horas luego de faenar al animal. Todos los folículos que no presentan indicios de atresia folicular, entre 2 y 8 mm de diámetro son aspirados. También se puede utilizar una pequeña máquina de aspiración. La recuperación es moderada y la calidad (capacidad de los ovocitos de completar la meiosis) es buena, en comparación con la técnica de desmenuzamiento (con una hoja de afeitar, se corta la superficie del ovario), en la cual la recuperación es alta pero la calidad de los ovocitos es baja. (LLIGUISUPA, Víctor. 2012).

1.8.2 Métodos de recolección de ovocitos.

1.8.2.1 Recolección de ovocitos por punción.

El método más simple y comúnmente empleado es el de aspiración de los COCs que consiste en la succión de los folículos situados en la superficie del ovario por medio de una aguja. El diámetro de la aguja utilizada es 20-22g, unidas a jeringas de 3 a 20 ml, es considerado importante a efectos de no dañar los ovocitos recogidos. (BRACKET, G 1995).

GRAFICO 7. PUNCIÓN DE FOLÍCULOS.



Fuente: MANJARRÉS, Oscar.2015.

1.8.2.2 Recolección de ovocitos por corte folicular.

Los ovarios se transportan al laboratorio en solución salina suplementada con antibióticos a temperatura entre 35 a 37 °C. En el laboratorio se realiza la remoción del tejido adyacente del cuerpo lúteo y de sangre con lavados de solución salina y alcohol. El método de corte consiste en colocar cada uno de los ovarios en cajas petri que contienen el medio de cultivo y se corta la superficie y el interior de los ovarios a lo largo y a través de este con cuchillas separadas por 2 mm. (LÓPEZ, M.2000).

1.9 Calificación de ovocitos por calidad y madurez.

La clasificación de los ovocitos para su cultivo in vitro se basa en el número de capas del cumulo que le rodea, se clasificaran en cuatro grupos, dividiendo los ovocitos con cumulo completo en dos tipos 1 y 2 según la compactación de sus capas (BRACKET, G.1995).

CUADRO 2. CLASIFICACIÓN DE LOS OVOCITOS.

CLASIFICACIÓN	CRITERIOS
1	<p>Cúmulus con capas múltiples</p> <p>Cúmulus compacto</p> <p>La totalidad de los ovocitos es clara y transparente</p> <p>Citoplasma homogéneo</p>
2	<p>Cúmulus como 1 o más oscuro y menos transparente</p> <p>Ooplasma con granulación más gruesa y más oscura que en 1 en la periferia</p>
3	<p>Cúmulus menos compacto, más oscuro que en 1 o 2</p> <p>Con manchas oscuras</p>
4	<p>Cúmulus expandido</p>
Buena	<p>Cúmulus con capas múltiples, compacto pero traslucido</p> <p>Ooplasma con granulación fina, densa y uniforme</p> <p>Cúmulus ligeramente expandido, con menor número de capas que pueden cubrir la mitad de la zona pelúcida, granulaciones ligeramente más gruesas</p>
Regular	<p>Cúmulus parcialmente expandido y disperso</p> <p>Red de uniones con presencia de células del cúmulus</p> <p>Ovocitos pequeños o grandes, ovocitos desnudos</p>
Mala	<p>Cumulus muy oscuro (marrón oscuro, negro)plasma de color muy o negro</p> <p>Ooplsma bueno con áreas muy claras o muy oscuras</p>

Fuente: Palma Gustavo (2001)

1.10 Técnicas de Crioconservación.

Existen dos grandes estrategias de crioconservación

Procedimientos de congelación lenta o de equilibrio.

Procedimientos de congelación ultra rápida o de no equilibrio. (LORENZO P.1994).

1.10.1 Congelación lenta.

Para cada célula hay un ritmo óptimo de enfriamiento. El ritmo de congelación condiciona el ritmo de descongelación. El uso de crioprotectores hace que el agua salga a través de la membrana plasmática y se congela fuera de la célula, por lo tanto la célula se deshidrata, esto sucede por la mayor presión extracelular que el agua es salida de la célula tiende a equilibrarse, el tiempo en que se expone el ovocito al crioprotector es de 10 a 30 minutos de duración lo cual permitirá una deshidratación adecuada (NIEMAN, 1991).

La deshidratación del ovocito reduce el riesgo de formación de cristales de hielo intracelulares que no son nocivos para las células, si el descenso térmico es demasiado rápido no hay tiempo suficiente para que salga el agua necesaria del ovocito y se formen cristales de hielo dentro de la célula (FRIETLER et.al.,1998).

Los rangos de congelación más usuales consisten en un descenso de la temperatura a un ritmo de 0.3 – 0.5 grados centígrados por minuto desde el momento que comienza la formación de hielo, que suele ser entre -5 y -9 grados centígrados hasta llegar a una temperatura de -33, -40 grados centígrados y posteriormente pasar directamente al nitrógeno líquido (SHAW et.al., 2000).

Sin embargo se debe tomar en cuenta que a una temperatura entre -5 y -9 grados centígrados puede haber un sobre enfriamiento en la pajilla con lo que se formarán cristales de hielo en el interior de la célula, dañando de esta manera sus organelos, con la finalidad de evitar la formación intracelular de cristales de hielo se realiza el seeding, el cual consiste una vez estabilizada durante 5 minutos la pajilla a una temperatura entre -5 y -9 grados centígrados, se toca su pared con un

objeto enfriado a -196 grados centígrados y de este modo se cristaliza el líquido extra celular de manera controlada (MAURER,1978).

1.10.2 Vitricación

La vitricación es la transición de una solución acuosa del estado líquido al estado vítreo (sólido) sin pasar por el estado sólido cristalizado (FAHY et.al., 1984).

Para conseguir la vitricación del ovocito, el medio crioprotector debe tener una concentración alta 5 ó 6 M, en comparación de la concentración utilizada en la congelación lenta 1 a 2 M y aunando a esto se requiere un descenso de temperatura de manera ultrarrápida, ambos deben estar presentes para evitar la formación de cristales de hielo pueden influir algunos factores como: el volumen de la muestra, viscosidad de la solución y de la rapidez de la congelación (ARAV et.al., 2000).

Todos los sistemas de vitricación exponen a los ovocitos primero a una solución de mantenimiento, después a una de equilibrio y finalmente a la vitricación, dado que en estas soluciones va aumentando la concentración del crioprotector, el ovocito va adaptando a dichas soluciones progresivamente, de esta manera se pretende disminuir los daños causados por la formación de hielo intracelular por otro lado, en la etapa de vitricación se incorporan carbohidratos, y también hacen con diferentes concentraciones hasta establecer el habitual para ellos (MARTINO et.al.,1996).

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

En este capítulo se detalla la metodología y materiales utilizados para realizar la presente investigación, se describe las características y ubicación del lugar donde se desarrolló la investigación.

2.1 Características del lugar.

Situación política.

Provincia: Cotopaxi

Cantón: Latacunga

Parroquia: Eloy Alfaro

Barrio: Salache Bajo

Situación geográfica.

Latitud: 00°59'47,68" S

Longitud: 78°31'9,16" E

Altitud: 2757 m.s.n.m.

Datos meteorológicos.

Temperatura promedio: 10,7°C

Pluviosidad: 175 mm (anuales)

Horas luz/día: 12 horas

Viento: Sureste – Noreste

Nubosidad anual: 4,718

Fuente: Registros Administración CEYPSA 2007.

2.2 Materiales.

2.2.1 Materiales de oficina.

- Papel bond
- Cds
- Libreta de apuntes
- Copias
- Anillados
- Empastados
- Impresiones

2.2.2 Recursos tecnológicos.

- Cámara digital
- Impresiones
- Flash memori

2.2.3 Materiales de laboratorio.

- Mandil
- Guantes
- Etilen glicol
- Agua inyectable
- Caja Petri estéril
- Centrifuga
- Pipeta para captar los embriones
- Pajillas estériles
- Canastillas
- Artefacto de congelamiento
- Pinzas para el “seeding”
- Estereoscopio
- Sustancia de holding
- Nitrógeno líquido
- Jeringuillas
- Tijera

2.2.4 Materiales de campo.

- Overol
- Termo
- Botas
- Guantes
- Gorra

2.2.5 Material biológico.

Ovarios de cerdas faenadas.

2.3 Tipo de Investigación.

2.3.1 Investigación experimental.

Se utilizó el tipo experimental, ya que se introdujo determinadas variables de estudio para controlar el aumento o disminución de las variables y su efecto en las conductas observadas.

2.3.2 Investigación Descriptiva.

Describe las características y los datos de la población o fenómeno en estudio, en este caso la crioconservación de los ovocitos extraídos de los ovarios de cerdas.

2.4 Metodología

Para esta investigación se utilizaron los métodos Deductivo y científico

2.4.1 Métodos

2.4.2 Método deductivo.

La deducción va de lo general a lo particular. El método deductivo es aquel que parte de los datos generales aceptados como valederos, para deducir por medio de razonamiento lógico varias suposiciones, es decir, parte de verdades previamente establecidas como principios generales, para luego aplicarlos a casos individuales y comprobar a si su validez. Con este método se pudo comparar entre los resultados y las hipótesis planteadas en la presente investigación.

2.4.3 Método científico.

El método científico es un proceso destinado a explicar fenómenos, establecer relaciones entre los hechos y enunciar leyes que expliquen los fenómenos físicos del mundo y permitan obtener, con estos conocimientos, aplicaciones útiles al

hombre. Este método se emplea para exponer el proceso utilizado para obtener los mejores resultados en esta investigación.

2.5 Análisis estadístico

El análisis se realizó de acuerdo a los datos recolectados durante la investigación.

2.5.1 Unidad de estudio.

La presente investigación se realizó con 15 cerdas por lo tanto 30 ovarios.

2.6 Variables evaluadas.

2.6.1 Calidad de ovocitos.

La calidad de los ovocitos se evaluó según las siguientes categorías.

- **Categoría 1.** Calidad buena, los ovocitos se encuentran completamente rodeados por tres capas de células del cúmulus y citoplasma homogéneo.
- **Categoría 2.** Calidad regular, los ovocitos están rodeados parcialmente por células del cúmulus o con citoplasma irregular.
- **Categoría 3.** Calidad mala, los ovocitos se encuentran totalmente desnudos.
- **Categoría 4.** Ovocito degenerado, los ovocitos se encuentran rodeados solo de fibrina.

2.6.2 Madurez de los ovocitos.

La madurez de los ovocitos se evaluó según las siguientes categorías.

- **Categoría 1.** Ovocitos con citoplasma granulado homogéneo y rodeado en su totalidad por una masa compacta de células de cumulo.
- **Categoría 2.** Ovocitos con citoplasma granulado homogéneo y rodeado en forma parcial por células del cumulo.

- **Categoría 3.** Ovocitos con citoplasma granulado homogéneo y desprovisto de células del cumulo.
- **Categoría 4.** Ovocitos con citoplasma polarizado y rodeado en su totalidad por células del cumulo.

2.7 Manejo del ensayo.

2.7.1 Recolección de ovarios de cerdas faenadas.

Un día antes se procedió a ingresar al camal para evaluar la condición corporal de los animales para su estudio, señalándoles con un marcador, el mismo que no interfirió con la señal de los dueños de los animales.

El marcaje fue de la siguiente manera 5 animales con grupo 1 que va condición corporal baja, con grupo 2 a los animales condición normal 3 y grupo 3 para los animales de condición corporal alta 4.

Dentro del faenamamiento lo realizaron por la técnica de aturdimiento en la articulación atlanto -axial, para seguir con el degolle y desangrado de las cerdas.

Se procedió al evisceramiento, donde se extrajo los ovarios y se colocó en envases estériles de orina con suero fisiológico, con su respectivo registro y transporte al laboratorio de biotecnología de la Reproducción de la Carrera de Medicina Veterinaria.

2.7.2 Selección del ovocito.

Previa llegada al laboratorio se procedió a la limpieza y desinfección del lugar, la misma que se la realizó con un amonio cuaternario y seguido a la colocación de la vestimenta adecuada.

Se realizó el secado con una toalla absorbente, con la misma se fija el ovario y se procede a la disección de las estructuras anexas al ovario como son ligamentos y bolsa ovárica.

Seguido se realiza la técnica de aspiración folicular, que consiste en inocular el bisel de una jeringa en los folículos del ovario y jalar el embolo para extraer el líquido folicular, para ponerlo en una caja petri con una gota de holding.

Se lo lleva al estereoscopio, donde con la ayuda de una micro-pipeta se procedió a pasar a los ovocitos en varias gotas de holding para limpiarlo, ya limpios se los calificó, ya que el procedimiento de lavado puede hacer que un ovocito de buena calidad termine como de mala calidad.

2.7.3 Selección de ovocitos por calidad y madurez.

La selección se realizó siguiendo los siguientes criterios para el parámetro calidad.

Categoría 1. Calidad buena, los ovocitos se encuentran completamente rodeados por tres capas de células del cúmulus y citoplasma homogéneo.

Categoría 2. Calidad regular, los ovocitos están rodeados parcialmente por células del cúmulus o con citoplasma irregular.

Categoría 3. Calidad mala, los ovocitos se encuentran totalmente desnudos.

La selección se realizó siguiendo los siguientes criterios para el parámetro madurez.

Los ovocitos de calidad 1 se procede a evaluar la madures con los siguientes criterios.

Categoría 1. Ovocitos con citoplasma granulado homogéneo y rodeado en su totalidad por una masa compacta de células de cumulo.

Categoría 2. Ovocitos con citoplasma granulado homogéneo y rodeado en forma parcial por células del cumulo.

Categoría 3. Ovocitos con citoplasma polarizado y rodeado en su totalidad por células del cumulo.

Los ovocitos calificados en calidad 1 e Inmaduros se proceden a colocarles en una gota del crio protector etilen glicol, por unos cinco minutos.

2.7.4 Crioconservación de ovocitos.

Se coloca en una micro pipeta la pajilla se absorbe etilen glicol limpio, se deja una burbuja para luego absorber a los ovocitos de calidad I e Inmaduros con medio etilen glicol, otra burbuja, y por ultimo otra gota de etilen glicol, y el tapón de la pajilla

Se prende la crio conservadora y se coloca el nitrógeno líquido en la misma para que inicie el descenso de temperatura ambiente a – 6 grados centígrados en donde se grados centígrados y se saca de la crio conservadora las pajillas e inmediatamente se coloca en el termo de nitrógeno líquido.

2.7.5 Descongelamiento de ovocitos.

Las pajillas se sacaron del tanque de nitrógeno líquido, se colocó en un termo con agua a 36 grados centígrados, luego se colocó en una caja petri para observar en el estereoscopio, posteriormente se evaluó la morfología de los ovocitos y evidenciar su viabilidad post descongelación.

CAPÍTULO III.

1. Análisis de los Resultados.

En este capítulo se detalla a continuación los resultados obtenidos al culminar el procedimiento de crio conservación lenta de ovocitos de cerdas de diferente condición corporal.

1.1 Resultados obtenidos de los ovocitos de cada ovario.

Se evaluó los ovocitos de cada ovario, determinando su calidad y madurez antes y después del proceso de crioconservación.

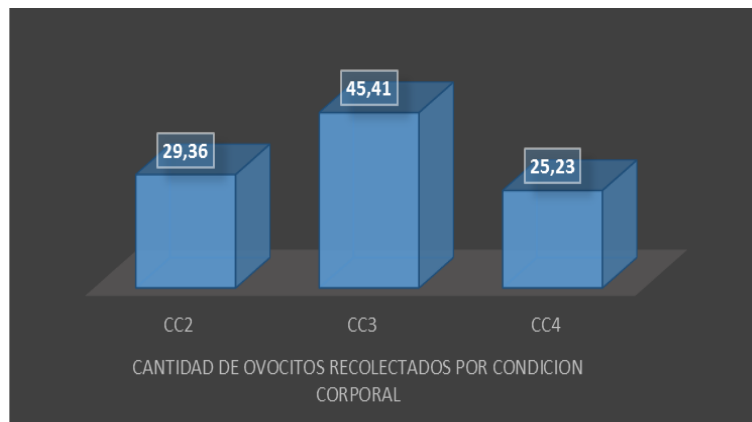
TABLA N° 1. RESULTADOS GENERALES DE LA CALIDAD DE LOS OVOCITOS POR CATEGORIAS

OVARIOS	GRUPOS	CANT.OVOCITOS POR OVARIO	CALIDAD DE LOS OVOCITOS RECOLECTADOS POR CATEGORÍAS		
			CATEGORIA I	CATEGORIA II	CATEGORIA III
1	G1 (C.C. 2)	6	2	3	1
2		7	4	1	2
3		5	3	1	1
4		7	5	1	1
5		6	4	1	1
6		6	3	1	2
7		7	5	1	1
8		5	3	2	1
9		7	5	1	1
10		8	5	2	1
11	G2 (C.C. 3)	12	10	1	1
12		8	6	1	1
13		9	8	0	1
14		10	9	0	1
15		9	7	1	1
16		8	7	0	1
17		10	9	0	1
18		11	9	1	1
19		10	8	1	1
20		12	9	0	3
21	G3 (C.C.4)	6	4	1	1
22		5	3	1	1
23		6	3	1	2
24		4	4	0	0
25		5	4	1	0
26		5	3	1	1
27		6	4	1	1
28		5	3	1	1
29		7	4	2	1
30		6	4	1	1
TOTAL		218	157	28	33
PORCENTAJE		100	72,02	12,844	15,14

FUENTE: Directa

ELABORADO POR: MANJARRES, Oscar 2015

GRAFICO N° 8. PORCENTAJE GENERAL DE OVOCITOS POR CONDICION CORPORAL



FUENTE: Directa

ELABORADO POR: MANJARRES, Oscar.2015

Según la Tabla No 1 y Gráfico No 8, se obtuvo 218 ovocitos equivalente al 100% de los tres grupos, de los cuales en el grupo 1 con condición corporal 2 con 64 ovocitos equivalente a un porcentaje de 29,36% en condición corporal 3 en el grupo 2 con 99 ovocitos equivalente a 45,41 %, en el grupo 3 con condición corporal 4 se obtuvieron 55 ovocitos lo que representa el 25,23 %.

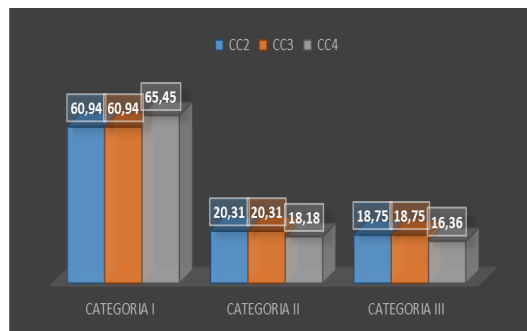
**TABLA N° 2. RESULTADOS DE LA CALIDAD DE OVOCITOS
RECOLECTADOS POR CATEGORIAS SEGÚN CONDICION CORPORAL.**

OVARIOS	GRUPO	CANT.OVOCITOS POR OVARIO	CALIDAD DE LOS OVOCITOS RECOLECTADOS POR CATEGORÍAS		
			CATEGORIA I	CATEGORIA II	CATEGORIA III
1	G1 (C.C. 2)	6	2	3	1
2		7	4	1	2
3		5	3	1	1
4		7	5	1	1
5		6	4	1	1
6		6	3	1	2
7		7	5	1	1
8		5	3	2	1
9		7	5	1	1
10		8	5	2	1
Total		64	39	13	12
%		100	60,94	20,313	18,75
11		G2 (C.C 3)	12	10	1
12	8		6	1	1
13	9		8	0	1
14	10		9	0	1
15	9		7	1	1
16	8		7	0	1
17	10		9	0	1
18	11		9	1	1
19	10		8	1	1
20	12		9	0	3
Total	99		82	5	12
%	100	82,83	5,0505	12,12	
21	G3 (C.C4)	6	4	1	1
22		5	3	1	1
23		6	3	1	2
24		4	4	0	0
25		5	4	1	0
26		5	3	1	1
27		6	4	1	1
28		5	3	1	1
29		7	4	2	1
30		6	4	1	1
Total	55	36	10	9	
%	100	65,45	18,182	16,36	
TOTAL		218	157	28	33
PORCENTAJE		100	72,02	12,844	15,14

FUENTE: Directa

ELABORADO POR: MANJARRES, Oscar

**GRAFICO N° 9. PORCENTAJE DE OVOCITOS POR CATEGORIAS
SEGÚN CONDICIÓN CORPORAL.**



FUENTE: Directa

ELABORADO POR: MANJARRES, Oscar. 2015

Como se observa en la Tabla No 2 y Gráfico No 9, se obtuvo en el grupo 1 64 ovocitos equivalente al 100% de los cuales se clasifico según su calidad en categorías, obteniendo 39ovocitos de categoría I, representando el 60,94%, 13 Ovocitos de categoría II, representando el 20,3%, y 12 ovocitos de categoría III, representando el 18,75%. En el grupo 2 se obtuvo 99ovocitos que representa el 100% según su calidad en categorías, obteniendo 82ovocitos de categoría 1, representando el 82,83%, 5 Ovocitos de categoría II, representando el 5,05%, y 12 ovocitos de categoría III, representando el 12,12%. En el grupo 3 se obtuvo 55 ovocito equivalentes al 100% de los cuales en la categoría I 36 con el 65,45%, categoría II 10con el 18,18 %y la categoría III con un porcentaje 16,36 %por ser 9 el número de ovocitos en esta categoría .Por lo tanto la condición corporal 3 influye directamente en la produccuión de ovocitos categoría 1 y poder someterlos a la crioconservación.

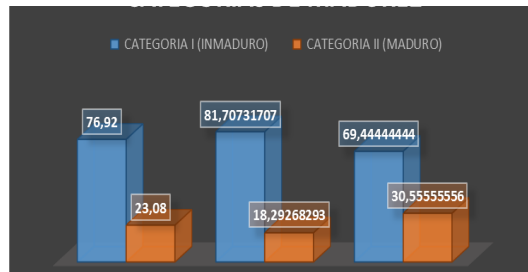
**TABLA N° 3 RESULTADOS DE LA MADUREZ DE OVOCITOS
RECOLECTADOS DE LA CATEGORIA I.**

OVARIOS	GRUPOS	OVOCITOS RECOLECTADOS EN CATEGORIA I	MADUREZ DE LOS OVOCITOS	
			CATEGORIA I (INMADURO)	CATEGORIA II (MADURO)
1	G1 (C.C. 2)	2	2	0
2		4	2	2
3		3	2	1
4		5	5	0
5		4	4	0
6		3	2	1
7		5	3	2
8		3	3	0
9		5	3	2
10		5	4	1
Total		39	30	9
%	100	76,92	23,08	
11	G2 (C.C 3)	10	8	2
12		6	6	0
13		8	5	3
14		9	7	2
15		7	7	0
16		7	6	1
17		9	5	4
18		9	9	0
19		8	7	1
20		9	7	2
Total	82	67	15	
%	100	81,71	18,29	
21	G3 (C.C4)	4	3	1
22		3	3	0
23		3	0	3
24		4	2	2
25		4	3	1
26		3	3	0
27		4	3	1
28		3	3	0
29		4	3	1
30		4	2	2
Total	36	25	11	
%	100	69,44	30,56	
TOTAL GENERAL		157	122	35
%		100	77,71	22,29

FUENTE: Directa

ELABORADO POR: MANJARRÉS, Oscar.2015

GRAFICO N° 10 PORCENTAJE DE OVOCITOS POR CATEGORIAS DE MADUREZ



FUENTE: Directa

ELABORADO POR: MANJARRÉS, Oscar.2015

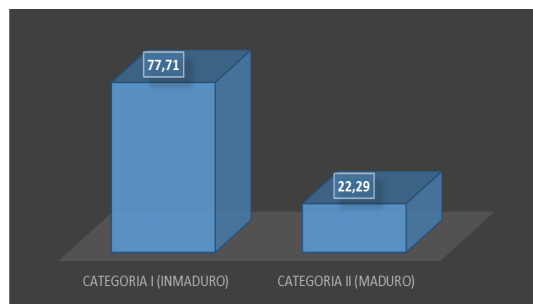
Como se observa en la Tabla No 4 y Gráfico No 11, se obtuvo 157 ovocitos dentro de la categoría I en el parámetro calidad equivalente al 100% de los cuales se clasifico según su madurez en categorías, en el grupo 1 con 39 que es el 100% de los cuales 30 en Calidad I con el 76,92% y 23,08% en el Calidad II con 9 ovocito; en el grupo 2 se evidencia 82 que representa el 100% en donde categoría I con 67 equivalente al 81,71% y categoría II con 15 que representa el 18,29; en el grupo 3 36 ovocitos que equivale al 100% en donde en calidad I 25 con el 69,44% y en calidad II con 11 que es el 30,56%.

Según Tabla No 4 se obtiene en la categoría 1 de calidad 157 equivalente al 100% de los cuales 122 ovocitos de categoría I, en general de los tres grupos, representando el

77,71%, 32 Ovocitos de categoría II, representando el 22,29%.

GRAFICO N° 11. PORCENTAJE DE OVOCITOS TOTAL EN

MADUREZ



FUENTE: Directa

ELABORADO POR: MANJARRÉS, Oscar. 2015.

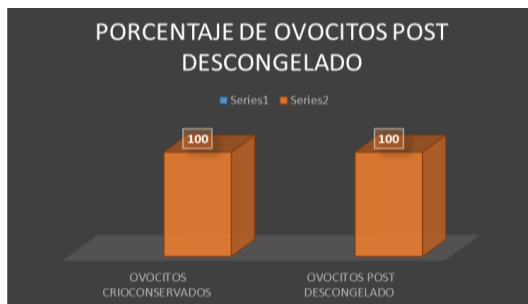
TABLA N°4. RESULTADO DE LA CRIOCONSERVACIÓN DE LOS OVOCITOS DE CATEGORÍA 1 SEGÚN SU CALIDAD Y MADUREZ.

OVARIO	GRUPOS	OVOCITOS CRIOCONSERVADOS	OVOCITOS POST DESCONGELACIÓN
1	G1 (C.C. 2)	2	2
2		2	2
3		2	2
4		5	5
5		4	4
6		2	2
7		3	3
8		3	3
9		3	3
10		4	4
Total		30	30
%	100	100	
11	G2 (C.C 3)	8	8
12		6	6
13		5	5
14		7	7
15		7	7
16		6	6
17		5	5
18		9	9
19		7	7
20		7	7
Total	67	67	
%	100	100	
21	G3 (C.C4)	3	3
22		3	3
23		0	0
24		2	2
25		3	3
26		3	3
27		3	3
28		3	3
29		3	3
30		2	2
Total	25	25	
%	100	100	

FUENTE: Directa

ELABORADO POR: MANJARRÉS, Oscar.2015

GRÁFICO N°12. RESULTADO DE LA CRIOCONSERVACIÓN DE LOS OVOCITOS DE CATEGORÍA 1 SEGÚN SU CALIDAD Y MADUREZ.



FUENTE: Directa

ELABORADO POR: MANJARRÉS, Oscar.2015

Como se observa en la Tabla No 5 y Gráfico No 13, los 122 ovocitos de categoría I tanto en el parámetro de calidad y madurez, después de haber sido crioconservados y posteriormente descongelados no presentaron ninguna alteración, todos conservaron la misma calidad perteneciendo a la categoría 1, es decir el 100%.

CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos en la presente investigación realizada en el laboratorio de biotecnología de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi, permite llegar a las siguientes conclusiones.

- El procedimiento se realizó con 30 ovarios correspondientes a 15 cerdas y se obtuvo 218 ovocitos equivalente al 100% de los cuales se clasificó según la condición corporal, en el grupo 1 64 ovocitos en donde 30 son categoría I en el parámetro calidad; en el grupo 2 99 ovocitos con 67 de calidad I y en el grupo 3 con 55 ovocitos con 25 de calidad I, lo que determina que el grupo 2 con condición corporal 3 es el más viable.
- El parámetro madurez se evaluó de los 157 ovocitos de Calidad I, en donde en el grupo 1 con 30 ovocitos de categoría I, en grupo 2 con 67 y grupo 3 con 25, total ovocitos de calidad y madurez I 122.
- La criopreservación no afectó a los 122 ovocitos, demostrando que la técnica empleada para preservar células femeninas es la más adecuada para realizar este procedimiento.

RECOMENDACIONES.

Se debe fomentar a los estudiantes a seguir realizando este tipo de investigaciones en el Laboratorio de Biotecnología de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi, pues los avances en reproducción nos permiten seguir caminando en el mejoramiento genético, calidad de producción y perpetuar la especie de las distintas especies dedicadas a la explotación pecuaria.

Se debería tomar como una alternativa el proceso de crioconservación para guardar ovocitos y así crear un banco genético con células sexuales femeninas, que es muy viable y económico pudiendo acceder a ella empresas, personas en general para mejorar genéticamente sus granjas obteniendo mejores ingresos económicos.

BIBLIOGRAFÍA.

- AZADA, D, “Criopreservación de ovocitos y fertilización in vitro en bovinos” Primera Edición, Año 2000, ISBN: 698352124530.
- BAKER, L. (2009). *El ciclo astral del cerdo*.
- BO, G. (2012). *Memorias 9 Congreso de Producción e Industria Animal*. Venezuela: Valera.
- CABELLO PEREZ, M., & CABELLO GONZÁLEZ, J. (2009). *Procedimientos Aduaneros I, Conceptos básicos*. España - Madrid: TARIC.
- ESPINOZA, José Luís. (2009). *Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos*. Colombia: Munera.
- JAINUDEEN, M, DELAVEAV, WAHID, H, HAFEZ, E, “Inducción de ovulación, producción y transferencia de embriones en reproducción e inseminación artificial en animales” Editorial Mc Graw Hill Interamericana, México, Año 2002, ISBN: 987455227.
- LIM, P, “Fertilización in vitro en bovinos y biotecnología de la reproducción animal, Año 2001, ISBN: 50361849845.
- LLIGUISUPA, Víctor, TESIS, “Evaluación de la calidad de ovocitos bovinos con la técnica de vitrificación en el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la Universidad Técnica de Cotopaxi, Año 2013”.
- OCHANDO, Ivàn. (2012). *Calidad Ovocitoria*. España: Eumet.
- BO, G. (2012). *Memorias 9 Congreso de Producción e Industria Animal*. Venezuela: Valera.
- CABELLO PEREZ, M., & CABELLO GONZÁLEZ, J. (2009). *Procedimientos Aduaneros I, Conceptos básicos*. España - Madrid: TARIC.
- PALMA, Gustavo. (2011). *Biología de la reproducción*. Argentina *onario Ginecológico*. Recuperado el 18 de Enero de 2014, de <http://www.institutobernabeu.com/es/11-1-1/diccionario/729/zona-pelucida/a:> Ecoe.
- VILA L.1984. Principios químicos – físicos de la crioconservación de material biológico.

SUÑOL J.2002. Congelación de ovocitos para reproducción asistida. Revista Iberoamericana de fertilidad.

LORENZO P.L, HILLERA M.J., 1994. Maduración in vitro de ovocitos de ganado vacuno: obtención de ovocitos y efecto de suplementación sérica en medios de maduración. Medicina Veterinaria.

ALBARRACÍN, M, “Vitrificación de ovocitos bovinos mediante la técnica Open Pulled Strown: Estudio estructural de cromosomas microtúbulos y microfilamentos y posterior desarrollo embrionario in vitro. Tesis de Doctorado en Medicina y Cirugía de animales. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. Bellaterra, Año 2005, ISBN: 9582436371

ALBARRAN, E, CALDERÓN, R, “Inseminación artificial y Andrología Veterinaria”, Tomo 1, Editorial Felix Varela, La Habana, Año 2007, ISBN: 9682446481

BRACKET, G, “Avances en Zootecnia: Nuevas técnicas de reproducción en cerdos”, Editorial Acribia Zaragoza, ISBN: 9714574116

CASTELLANOS. Fernán, “Producción animal 2 Cerdos”. Editorial TRILLAS, S.A. de C.V. (México, D.F.).Tercera Edición. Año 2008. ISBN: 9789682481307

LIM, P, “Fertilización in vitro en bovinos y biotecnología de la reproducción animal, Año 2001, ISBN: 50361849845

OGLESBEE, Bárbara, “La consulta Veterinaria en 5 minutos: hurones y conejos”. Editorial Inter Médica. Primera edición. Año 2008. ISBN. 9789505553433

SISSON y GROSSMA, “Anatomía de los Animales Domésticos” Año 2002.ISBN: 9788445807217.

BIBLIOGRAFÍA VIRTUAL.

ALBARRACÍN, Ángel “Anatomía Fisiología y comportamiento del cerdo” (artículo en línea) En: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=5153>.

PATRONE, Daniela “Enciclopedia del Cerdo” (artículo en línea) En: <http://www.monografias.com/trabajos15/mundo-cerdo/mundo-cerdo.shtml>.

MENDEZ.A;2013;vitrificación como técnica de crioconservación <http://redsocialeducativa.euroinnova.edu.es/engine/handlers/pagehandler.php/blog>

[/read/576179/vitrificacin-como-tnica-de-crioconservacin-de-embriones-bovinos?handler=blog&page=read/576179/vitrificacin-como-tnica-de-crioconservacin-de-embriones-bovinos.](#)

REGISTRO No1

TOTAL DE OVOCITOS RECOLECTADOS																															
CONDICIÓN CORPORAL 2,3Y4																															
OVARIOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	TOTAL
OVOCITOS	6	7	5	7	6	6	7	5	7	8	12	8	9	10	9	8	10	11	10	12	6	5	6	4	5	5	6	5	7	6	218

REGISTRO No 2

		NUMERO DE OVOCITOS RECOLECTADOS POR CATEGORIAS																														TOTAL
		CONDICION CORPORAL 2										CONDICIÓN CORPORAL 3										CONDICIÓN CORPORAL 4										
OVARIOS		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
CATEGORÍA 1		2	4	3	5	4	3	5	3	5	5	10	6	8	9	7	7	9	9	8	9	4	3	3	4	4	3	4	3	4	4	
CATEGORÍA2		3	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	2	1	
CATEGORÍA3		1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	2	0	0	1	1	1	1	1	
		TOTAL DE OVOCITOS RECOLECTADOS																														218

REGISTRO No3

CALIDAD DE OVICITOS RECOLECTADOS EN CATEGORIA 1											
OVARIOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL
CONDICIÓN CORPORAL 2	2	4	3	5	4	3	5	3	5	5	39
CONDICIÓN CORPORAL 3	10	6	8	9	7	7	9	9	8	9	82
CONDICIÓN CORPORAL 4	4	3	3	4	4	3	4	3	4	4	36
TOTAL RECOLECTADO											157

Fotos.

Cerdas de matadero según condición corporal



Muestras (ovarios de cerdas faenadas).



Limpieza de los ovarios.



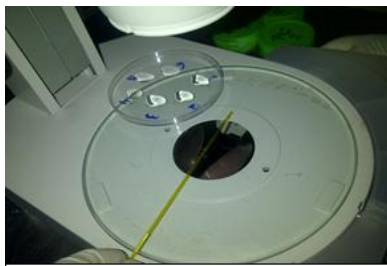
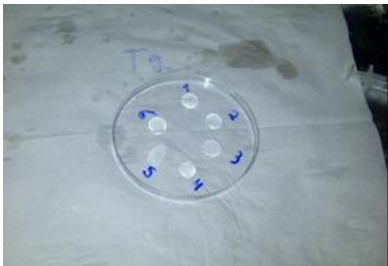
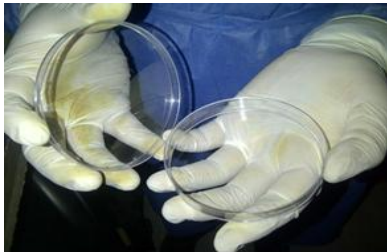
Aspiración de folículos.



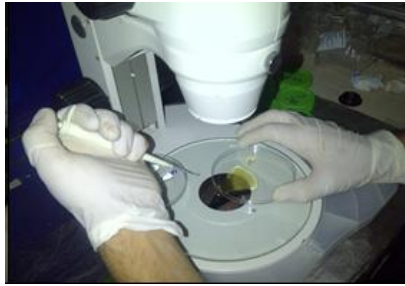
Obtención del líquido folicular.



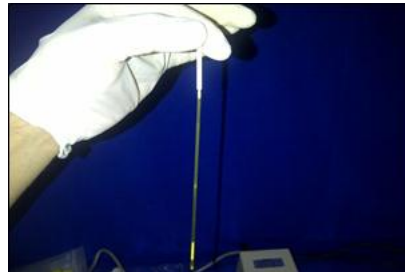
Lavado de ovocitos en la solución de holding.



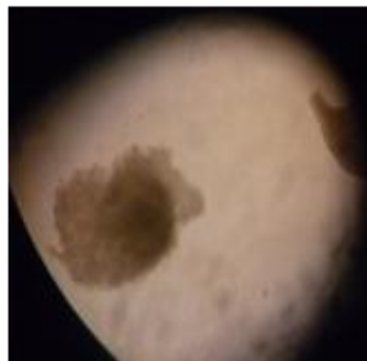
Adición de etilenglicol como crioprotector.



Congelación de los ovocitos obtenidos.



Clasificación de ovocitos.



Calidad los ovocitos dedespués de descongelar.

